



*Túneles*, 2010

# Mecanismos de infección del virus de influenza

♦ José Luis Montiel  
Genoveva Bustos Rivera

La influenza es una enfermedad aguda de las vías respiratorias altamente contagiosa, de morbilidad elevada y capaz de provocar complicaciones potencialmente letales en pacientes de riesgo, como es la población infantil o los adultos mayores. Esta enfermedad es causada por el virus de la influenza, el cual constituye un importante problema de salud a nivel mundial. Este virus se encuentra dentro de la familia *Orthomyxoviridae* debido a que su material genético es de ácido ribonucleico (ARN) segmentado de polaridad negativa. Existen tres tipos antigénicos básicos, llamados influenza A, B y C, los cuales están determinados por sus características antigénicas y presentan un genoma conformado por siete u ocho segmentos de ARN.

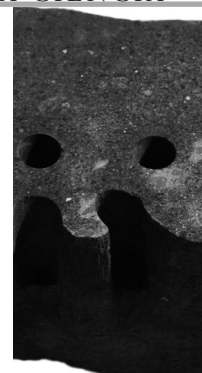
El tipo A es el principal causante de enfermedad en el humano y en animales, y por ello el más estudiado. Su genoma codifica para once proteínas; en la membrana se localizan dos de ellas: hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA), las cuales juegan un papel importante en la adhesión y penetración del virus a las células epiteliales, así como en la liberación por la célula de nuevas partículas virales. Asimismo, estas proteínas contienen los determinantes neutralizantes más importantes, por lo que son los principales blancos moleculares cuando se desarrollan vacunas específicas. Una tercera proteína asociada a la membrana es la de la matriz

2 (M2), que actúa como un canal de iones y que se forma por el procesamiento alternativo del segmento de ARN viral que codifica para la proteína M1. Esta proteína forma una matriz por debajo de la bicapa lipídica que le da soporte y que engloba al genoma.

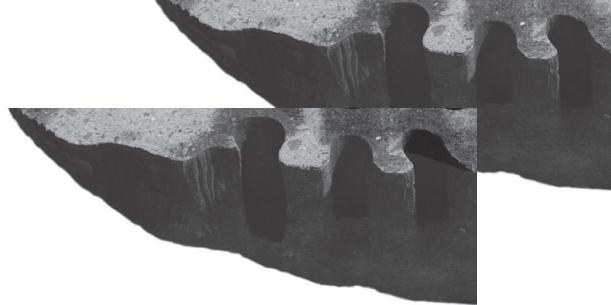
Asociadas a éste se encuentran las polimerasas PB1, PB2 y PA, así como la nucleoproteína (NP). Las proteínas no estructurales NS1 y NS2 se sintetizan durante la infección y juegan un papel importante en la replicación viral, y es NS2 la que se origina por procesamiento alternativo del segmento de ARN que codifica para NS1. Recientemente se reportó la existencia de la proteína PB1-F2, con una longitud de ochenta y siete residuos de aminoácidos, la cual se genera por un marco de lectura +1 en el gen que codifica para PB1. Aunque se creía que era solamente accesoria, se reportó que esta proteína interactúa a nivel mitocondrial induciendo apoptosis en monocitos pero no así en fibroblastos y células epiteliales, posiblemente como un mecanismo a favor de la propagación y el aumento de la carga viral.

## Infección

Las células epiteliales de todo el tracto respiratorio constituyen los principales blancos de infección para el virus de influenza; sin embargo, éste es capaz de infectar también otros tipos celulares. Después



♦ Profesor e investigador, Facultad de Farmacia, UAEM  
Estudiante de maestría, Instituto de Biotecnología (Ibt), UNAM



de la infección viral y como consecuencia, en gran parte, de la muerte del tejido epitelial, se activan varios elementos del sistema inmune, innatos y adaptativos. Tanto la muerte de las células infectadas como la respuesta inflamatoria estimulada pueden provocar una respuesta inmunológica particularmente agresiva llamada “tormenta de citoquinas”, la cual constituye un aspecto fundamental para explicar esta patología y sus consecuencias mortales.<sup>1</sup>

Por otra parte, un aspecto de importancia para explicar la agresividad del virus es su capacidad para identificar receptores en la superficie de las células epiteliales. Desde los años treinta se descubrió que la unión del virus con las células del huésped depende principalmente de la presencia de un tipo de carbohidratos, el ácido siálico o neuramínico.<sup>2</sup> Actualmente se acepta que dependiendo de algunas variaciones en la estructura de su proteína HA el virus podrá asociarse más fácilmente con ácidos siálicos del tipo  $\alpha 2,6\text{Gal}\beta 1,6\text{Gal}$ , ampliamente distribuido a lo largo del tracto respiratorio humano y, por ello, con una mayor capacidad de provocar infección en la población.<sup>3</sup>

Posterior a su ingreso en la célula y debido a que tiene un genoma de ARN de polaridad negativa, el virus deberá servir primero de molde para la síntesis del ARN positivo. Este último es el material genético que hace posible la síntesis, por un lado,

de todas las proteínas virales y, por otro, de nuevos segmentos de ARN de polaridad negativa, los cuales permitirán a su vez formar nuevos virus.

Sin duda, un aspecto central en la infección del virus de influenza es la serie de eventos que ocurren en el interior de la célula entre las proteínas virales y los mecanismos de defensa de ésta. Como sabemos, los virus han optimizado estrategias para emplear la *maquinaria* de la célula para la síntesis de nuevos virus; sin embargo, la célula cuenta a su vez con mecanismos altamente selectivos para el reconocimiento y neutralización de la capacidad infectiva del virus. El resultado de este “enfrentamiento” decidirá el futuro de la infección: la eliminación del virus o su transmisión a las células vecinas.

Mientras el virus puede controlar los mecanismos de la célula, ésta despliega un conjunto de moléculas en las membranas (TLRs, RLR) y el citoplasma (MxA, PKR) que pueden detectar la presencia del virus activando diversos sistemas de protección. Entre ellos conviene destacar la acción de los interferones de tipo I (IFN  $\alpha$  y  $\beta$ ), los cuales son muy eficientes para inhibir la replicación viral, por lo cual son una parte central en los mecanismos para erradicar los virus.<sup>4</sup> Por su parte, el virus ha desarrollado estrategias que le permiten evadir la respuesta antiviral de los IFN, donde la proteína viral NS1 parece tener un papel central. Su impor-

---

<sup>1</sup> Jeffrey K. Taubenberger y David M. Morens, “The pathology of influenza virus infections”, en *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, vol. 3, 2008, pp. 499-522.

<sup>2</sup> John M. Nicholls, Renee W. Y. Chan, Rupert J. Russell, Gillian M. Air y L. S. Malik Peiris, “Evolving complexities of influenza virus and its receptors”, en *Trends in Microbiology*, núm. 4, vol. 16, 2008, pp. 149-57.

<sup>3</sup> *Ibid.*

<sup>4</sup> Adolfo García-Sastre, “Antiviral responses in pandemic influenza viruses”, en *Emerging Infectious Diseases*, núm. 1, vol. 12, 2006, pp. 44-47.

tancia ha sido confirmada por estudios donde se inoculó un virus de influenza carente de la información necesaria para sintetizar la proteína NS1 en ratones. En estos experimentos no pudo bloquearse la generación de los IFN, por lo que los virus mostraron patogenicidad aunque ésta fue muy baja.<sup>5</sup> Otros mensajeros químicos importantes derivados de las células infectadas son también las moléculas IL-8 y TNF- $\alpha$ , cuyos efectos permiten inhibir la dispersión del virus, el reclutamiento de neutrófilos hacia el sitio de la infección y la muerte de las células infectadas. En este contexto se inserta nuestra propuesta de investigación básica, con la cual pretendemos conocer los elementos principales de la infección del virus de influenza humana en modelos celulares, así como la participación en ella de un mensajero químico característico de la regulación inflamatoria conocido como Factor de Crecimiento Transformante Beta (TGF- $\beta$ ).

### Regulación inmunológica

El TGF- $\beta$  es una citocina pleiotrópica que regula una amplia variedad de procesos biológicos, entre ellos, inflamación, quimiotaxis, reparación de tejidos, depósito de la matriz extracelular, tumorigénesis, proliferación, migración y diferenciación celular.<sup>6</sup> En su conjunto, el TGF- $\beta$  es una citocina reguladora con diversos efectos sobre las células inmunológicas, las cuales dependen de la unión de aquélla con dos receptores de membrana específi-

cos (TGF- $\beta$ RI y TGF- $\beta$ RII). Esto ocasiona la formación de un complejo de receptores y la activación de una región del receptor I, permitiendo a éste adicionar grupos de fosfato a los aminoácidos serinas/treoninas de las moléculas conocidas como Smad 2 y Smad 3. La fosforilación en estas moléculas favorece su acoplamiento con una molécula transportadora (Smad 4), lo cual permite su paso al núcleo celular y, con ello, la expresión de un amplio espectro de genes.<sup>7</sup>

Dado que se ha probado que esta molécula juega un papel fundamental en la regulación inmunológica, hemos sugerido que podría participar en la infección por el virus de influenza. En apoyo a esta propuesta se ha observado que los niveles del TGF- $\beta$  activo aumentan durante la infección viral, lo cual se ha sugerido que dependería de la acción de la glicoproteína NA.<sup>8</sup> Asimismo, se ha planteado que la presencia del TGF- $\beta$  activo favorece la muerte celular tanto de las células epiteliales como de las linfoides; sin embargo, el papel del TGF- $\beta$  en la infección por el virus de influenza se desconoce.

Adicionalmente, aunque la acción de las proteínas Smad 2 y Smad 3 ha permitido explicar varios efectos fisiológicos de esta citocina, en años recientes se ha descrito la activación de otros mecanismos en la célula, dentro de los cuales destaca la familia de proteínas MAPK (ERK 1 y 2, JNK, p38). Entre éstas, la molécula p38 parece cumplir una función central en la inducción de los eventos que

<sup>5</sup> *Ibid.*

<sup>6</sup> Yigong Shi y Joan Massague, "Mechanisms of TGF- $\beta$  signaling from cell membrane to the nucleus", en *Cell*, núm. 6, vol. 113, 2003, pp. 685-700.

<sup>7</sup> *Ibid.*

<sup>8</sup> Stacey Schultz-Cherry y Virginia S. Hinshaw, "Influenza virus neuraminidase activates latent transforming growth factor B", en *Journal of Virology*, núm. 12, vol. 70, 1996, pp. 8624-8629.



desencadenan la muerte celular, razón por la cual nos interesó evaluarla en este estudio.

### Justificación y resultados

A pesar de que han sido estudiados extensamente los mecanismos patológicos inducidos por el virus de influenza, aún no contamos con los elementos suficientes para explicar los diferentes efectos de los distintos tipos de virus entre las personas. En ese sentido, resulta significativo el hecho de que la reciente epidemia por el virus de influenza (A/California/15/04/2009/H1N1) registrara casos mortales principalmente entre los mexicanos (más de noventa muertes). De ahí que sea de gran utilidad conocer con mayor exactitud los elementos que intervienen en la evolución de la infección viral, ya que ello permitiría el diseño de estrategias de diagnóstico o tratamientos más eficientes que los ya existentes, toda vez que ha sido reportada la aparición de nuevos virus de influenza resistentes a los antivirales ahora disponibles.<sup>9</sup>

Por ello, en esta investigación se postula que la citocina TGF- $\beta$  tiene una participación importante en el desarrollo de la respuesta inflamatoria, lo que en los casos de infecciones virales sería decisivo para evitar consecuencias más graves por la infección del virus de influenza en la población humana.

Para la comprobación de esta hipótesis se ha empleado el virus de influenza A/H1N1/PR donado por el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (Indre), el cual fue propagado y adap-

tado para infectar células de mamífero en cultivo del tipo MDCK y A549, esto es, en células derivadas de riñón de perro, el primero, y en células derivadas de un cáncer de epitelio bronquial humano, el segundo. Asimismo, se emplearon las moléculas humanas recombinantes TGF- $\beta$  y TNF- $\alpha$ . Por técnicas convencionales de biología celular y virología se pudieron cuantificar las partículas virales y su capacidad infectiva en el cultivo de células.

A continuación se realizó una serie de experimentos para definir la cinética de infección con el virus de influenza en las células MDCK. Para ello, las células fueron sembradas en presencia de virus en una relación de una partícula viral por célula en diferentes momentos hasta las noventa y seis horas. Las muestras de células fueron evaluadas cada doce horas para determinar la presencia de proteínas virales (NS1) y la muerte de las células MDCK. De estos experimentos se obtuvo que el virus de influenza realmente infecta las células y provoca su muerte en la mayoría de los casos luego de treinta y seis horas de cultivo. Una cinética semejante se observó en las células de epitelio bronquial humano (A549). La muerte de las células fue verificada con dos técnicas diferentes: cambio en la permeabilidad de la membrana celular (evento temprano de apoptosis) y fragmentación de la cromatina (evento tardío de apoptosis).

Posteriormente, en otra serie de experimentos, confirmamos que las células infectadas fueron sensibles al efecto del TGF- $\beta$ , debido a que durante

---

<sup>9</sup> Patrick J. Collins, Lesley F. Haire, Yi Pu Lin, Junfeng Liu, Rupert J. Russell, Philip A. Walker, John J. Skehel, Stephen R. Martin, Alan J. Hay y Steven J. Gamblin, "Crystal structures of oseltamivir-resistant influenza virus neuraminidase mutants", en *Nature*, núm. 7199, vol. 453, 2008, pp. 1258-1261.

el transcurso de la infección conservaron en su superficie celular los dos receptores necesarios. En ensayos en paralelo observamos que los niveles de receptores aumentan de manera importante después de tratarlas por veinticuatro horas con el TGF- $\beta$ , pero esto no sucedió así con aquellas infectadas con el virus.

En otra serie de experimentos confirmamos que al tratar a las células MDCK con TGF- $\beta$  durante periodos breves de treinta minutos se ocasionaba la modificación por fosforilación de las proteínas Smad 2 y Smad 3 (vía canónica) y p38 (vía alternativa). Asimismo, observamos que el mismo tratamiento ocasionaba la muerte en células MDCK y A549 durante un periodo similar al de la infección viral. Estos resultados fueron verificados al emplear un conocido inductor de muerte celular, el TNF- $\alpha$ , el cual también ocasionó la muerte de las células.

Estos resultados nos indican que el virus de influenza que propagamos en el laboratorio es capaz de infectar y provocar la muerte de las células, como ha sido descrito en los estudios tanto en modelos animales como en autopsias de pacientes fallecidos por la infección de este virus.<sup>10</sup> Por otro lado, en congruencia con estudios previos de nuestro equipo de trabajo, observamos que el TGF- $\beta$  ocasiona cambios en distintos niveles de las células en cultivo: aumento en el nivel de sus receptores en la superficie de las células; activación de dos *cascadas* de señales hacia el interior de la célula: Smads 2/3 y p38, y por último, muerte por apoptosis de las células en cultivo.

Actualmente estamos evaluando si la infección del virus de influenza ocasiona la activación de señales inducidas por TGF- $\beta$ , así como si estas señales son necesarias para la inducción de muerte en las células. Finalmente, se continuará con la caracterización de los elementos moleculares más importantes que emplea el virus de influenza para provocar la muerte celular. En ese sentido, resulta interesante la observación de que el tratamiento con TGF- $\beta$  de las células previo a su infección por el virus, reduce de manera importante la muerte celular. Esto sugiere que el conocimiento adquirido permitiría identificar nuevos blancos para el desarrollo de antivirales específicos.

#### Estrategia inmunológica

El problema de las infecciones por el virus de influenza constituye un evento altamente significativo para la salud mundial, pues este virus ha sido el agente causal de una de las epidemias que más muertos ha dejado en la historia reciente, como lo vivimos hace poco. Aún falta mucho por conocer para poder contar con estrategias eficientes que contrarresten la aparición de nuevas variantes virales. Las nuevas estrategias para controlar la infección viral no sólo involucran su detección y neutralización, sino que han incorporado la respuesta inmunológica en el control de las infecciones, cuyo papel es fundamental. En la medida en que conocamos a detalle las propiedades de la respuesta inmunológica podremos predecir y controlar los aspectos negativos de las infecciones virales.

<sup>10</sup> Jeffrey K. Taubenberger y David M. Morens, "The pathology...", *op. cit.*, pp. 499-522.